梨小食心虫微卫星标记的扩增稳定性及多态性分析

郑　燕[1]，王　康[1]，李玉婷[1]，乔宪凤[2]，陈茂华[1,*]

（1. 西北农林科技大学植物保护学院，农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室，陕西杨凌 712100；2. 西北农林科技大学动物医学院，陕西杨凌 712100）

摘要：【目的】筛选适合我国梨小食心虫 *Grapholita molesta* 种群遗传学研究的微卫星位点，并依据所筛选的微卫星位点进行梨小食心虫地理种群的遗传多样性分析。【方法】利用欧洲梨小食心虫和苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 种群中已报道的 11 个微卫星位点，分析各位点在我国 12 个种群 257 头梨小食心虫样本中的扩增稳定性，再进行其多态性分析，筛选适合的位点，然后进行种群遗传多态性分析。【结果】在分析的 11 个微卫星位点中，位点 Gm01，Gm03，Gm04 和 Cyd15 无法稳定扩增；位点 Gm05 扩增成功率较低，位点 Gm07 遗传多态性较低；而位点 Gm02，Gm06，Gm08，Gm09 和 Gm10 等扩增效果稳定且遗传多态性丰富。这 5 个稳定扩增的微卫星位点平均等位基因数量（N_A）为 7.417～12.500，平均观察杂合度（H_o）为 0.366～0.655，平均期望杂合度（H_e）为 0.642～0.846，多态信息含量（*PIC*）为 0.800～0.935。【结论】本研究成功筛选出位点 Gm02，Gm06，Gm08，Gm09 和 Gm10 等 5 个微卫星位点。基于这 5 个微卫星位点标记的结果显示，山东和陕西不同梨小食心虫地理种群均具有丰富的遗传多样性。这 5 个位点可以适用于我国梨小食心虫种群的进一步遗传分析研究。

关键词：梨小食心虫；地理种群；微卫星位点；扩增稳定性；遗传多态性；无效等位基因

中图分类号：Q969　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2014)11-1335-08

Amplification stability and polymorphism of microsatellite loci in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in China

ZHENG Yan[1], WANG Kang[1], LI Yu-Ting[1], QIAO Xian-Feng[2], CHEN Mao-Hua[1,*] (1. Key Laboratory of Crop Pest Integrated Pest Management on the Loess Plateau of Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】The objective of this research was to screen microsatellite loci which were available for population genetic research of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* in China.【Methods】The amplification stability and genetic polymorphism of 11 microsatellite loci previously reported in European populations of *G. molesta* and *Cydia pomonella* were characterized from 257 individuals from 12 geographic populations of China. The screened polymorphic microsatellite loci were then used for population genetic analysis of the *G. molesta* populations.【Results】The results showed that loci Gm01, Gm03, Gm04 and Cyd15 could not be amplified from the samples. Gm05 could be amplified from a low proportion of individuals. Gm07 could be stably amplified, but was weakly polymorphic. Loci Gm02, Gm06, Gm08, Gm09 and Gm10 showed high polymorphism and could be amplified stably. For the five polymorphic loci, the mean number of alleles (N_A) ranged from 7.417 to 12.500, the values of mean observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were from 0.366 to 0.655 and from 0.642 to 0.846, respectively, and the polymorphic information content (*PIC*) was between 0.800 and 0.935.【Conclusion】We successfully selected five loci, *i. e.*, Gm02, Gm06, Gm08, Gm09 and Gm10. High genetic diversity of *G. molesta* populations sampled in Shandong Province and Shaanxi Province was revealed by data from these five loci. These five loci can be used for further population genetics research of *G. molesta* populations from China.

基金项目：国家自然科学基金项目(31071687)；瑞士联邦工学院和西北农林科技大学国际合作项目(317021101)

作者简介：郑燕，女，1987 年 9 月生，山东潍坊人，博士研究生，研究方向为昆虫分子生态学，E-mail：zhengyan536@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: maohua.chen@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received：2014-07-17；接受日期 Accepted：2014-10-17

Key words: *Grapholita molesta*; geographic population; microsatellite loci; amplification stability; genetic polymorphism; null allele

梨小食心虫 *Grapholita molesta* (Busck)属鳞翅目(Lepidoptera), 卷蛾科(Tortricidae), 是世界性的重要蛀果害虫之一(Rothschild and Vickers, 1991; Timm *et al*., 2008; Torrian *et al*., 2010)。我国是梨小食心虫的起源地之一(Rothschild and Vickers, 1991; Timm *et al*., 2008), 该虫在我国除了西藏未见报道外, 其他地区均有分布。梨小食心虫在我国不同地区一年发生 3 ~ 7 代, 其幼虫蛀食桃、李、樱桃、杏、梅、海棠等寄主的嫩梢, 以及桃、梨、梅、苹果、李、樱桃、杏、沙果、海棠、枣、山楂、木瓜、枇杷等寄主的果实和枇杷幼苗的主干, 果树嫩梢被害后萎蔫, 影响生长, 果实被钻蛀危害后大量落果, 产量和品质受到严重影响, 因此该虫每年给我国水果生产造成重大的经济损失(王源岷等, 1999; 陈梅香等, 2009)。国内关于梨小食心虫的地理分布、危害特性、生物学与生态学特性、发生规律及综合防治等方面的研究十分深入, 而关于其遗传多态性的研究鲜有报道(王源岷等, 1999; 何超, 2008; 陈梅香等, 2009)。

微卫星标记因其数量多、分布广、多态性丰富、共显性遗传、易检测、适用于自动化分析等特点(Weber and May, 1989; 王永模等, 2007; 张玲, 2007; Mikac, 2010), 目前被广泛应用于昆虫的种群遗传多样性研究(Roderick, 1996; 龚鹏等, 2001; Chen and Dorn, 2010; 安建东等, 2011)。微卫星基因的侧翼区在种内具有高度的保守性, 但有时也会发生碱基突变, 从而使基于侧翼区设计的引物扩增失效(Paetkau and Strobeck, 1995)。鳞翅目昆虫的许多微卫星序列存在于基因组的多个拷贝单元中, 并且其侧翼区序列非常相似, 该特点使得成功开发鳞翅目昆虫的微卫星位点更加困难(Zhang, 2004)。由于开发新的微卫星位点费用高、工作量大(Zane *et al*., 2002), 因此, 从相同种或者近缘物种已经报道的微卫星引物中筛选合适的引物, 是通常采用的一种简单、方便、快捷并且经济适用的方法(Kim *et al*., 2008)。但是, 相同物种的微卫星引物在不同种群中的个体中具有不同的扩增稳定性与遗传多样性, 这可能是长期的地理隔离导致微卫星位点侧翼序列改变, 或者导致微卫星位点缺失(Ravel *et al*., 2002; 门秋雷等, 2012)。梨小食心虫的微卫星位点在欧洲种群中已有报道(Torriani *et al*., 2010), 但是这些欧洲种群中的位点在我国种群中是否能稳定扩增还不明确, 本研究将分析这些已经报道的微卫星位点在采自我国的梨小食心虫种群中的扩增稳定性情况, 以期筛选出扩增多态性高, 扩增效果稳定的微卫星位点, 并优化扩增这些位点的 PCR 反应体系和反应条件, 为进一步我国研究梨小食心虫种群的遗传多样性提供合适的微卫星标记。

种群遗传多样性相关研究能够阐明寄主隔离、地理隔离、季节变化、害虫防治方法等因素均对同一害虫不同种群间的遗传演化、基因交流、抗药性发展等产生影响, 这对于优化和制定害虫的综合防治具有重要理论与实践意义(Franck *et al*., 2007; Timm *et al*., 2008; Fenton *et al*., 2010; Torriani *et al*., 2010; Kirk *et al*., 2013)。本研究利用我国采集的 12 个梨小食心虫种群, 分析在欧洲种群中已报道的 10 个梨小食心虫微卫星位点和 1 个苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.)微卫星位点在我国梨小食心虫样本中的扩增稳定性和遗传多样性, 旨在筛选出适合我国梨小食心虫种群遗传学研究的微卫星位点, 并分析山东和陕西不同地理种群的遗传多样性,为进一步深入开展我国梨小食心虫的种群多样性研究和综合防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于 2011 年 8 月 –2013 年 8 月, 分别在我国主要水果产区山东省和陕西省的桃、梨和苹果不同果园采集梨小食心虫样本(表 1)。每个采样区选取 1 个有代表性的果园, 每个果园采集梨小食心虫试虫 30 ~ 50 头左右, 同一果园各头试虫采集距离相隔 10 m 以上, 每棵果树上只采集 1 头试虫, 以此保证所采集的个体不是同一个亲本的后代, 同一地点的同一果园采集的试虫视为一个种群。试虫采集时, 将采自果树嫩梢或者果实中的幼虫剥出; 在有些大型果园中, 由于采用果实套袋结合密集的农药防治, 果园内很难采集到幼虫, 本研究在这些大型果园分散悬挂信息素诱芯, 在果园内每隔 10 m 左右挂一个信息素诱芯(北京中捷四方公司产品), 悬挂高度约 1.5 m, 连续 5 d 在果园不同位置悬挂诱芯, 每天挂 8 个, 每天从每个诱虫板上取 1 头梨小食心

虫；所有采集的幼虫或者成虫样本置于无水乙醇中，带回实验室后 -20℃条件下保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取

从各种群中随机取 19 ~ 22 头梨小食心虫样本，采用北京全式金生物技术有限公司的 EasyPure™ Genomic DNA Kit 试剂盒，分别单头提取各头试虫的基因组 DNA，提取方法参照试剂盒说明书。幼虫样本直接匀浆后进行基因组 DNA 提取；成虫样本提取基因组 DNA 前，先将样本整体浸泡于二甲苯中 5 ~ 10 min，以去除样本表面的粘虫胶。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 的完整性。

表 1 我国山东和陕西不同地区采集的梨小食心虫样本信息

Table 1 Sampling information of *Grapholita molesta* populations from different regions of Shandong Province and Shaanxi Province of China

种群代码 Population code	检测样本数 Number of individuals tested	采集地点 Sampling location	纬度/经度 Latitude/Longitude	试虫虫态 Sampling stage	寄主植物 Host plant	采集时间 Sampling date
TNM	22	山东泰安南马套 Nanmatao, Tai'an, Shandong	36°65.543′N, 117°00.521′E	幼虫 Larval	桃 Peach	2011.08
TSZ	22	山东泰安上庄 Shangzhuang, Tai'an, Shandong	36°06.245′N, 117°16.718′E	成虫 Adult	苹果 Apple	2011.08
TXJ	22	山东泰安许家庄 Xujiazhuang, Tai'an, Shandong	36°05.861′N, 117°13.366′E	成虫 Adult	梨 Pear	2011.08
WPY	22	山东潍坊平原 Pingyuan, Weifang, Shandong	36°20.910′N, 118°55.389′E	成虫 Adult	苹果 Apple	2011.08
WHS	22	山东潍坊红纱沟 Hongshagou, Weifang, Shandong	36°20.284′N, 118°56.300′E	成虫 Adult	桃 Peach	2011.08
WTY	22	山东潍坊桃园乡 Taoyuan, Weifang, Shandong	36°22.699′N, 119°35.535′E	成虫 Adult	梨 Pear	2011.09
YJP	19	山东烟台巨盆李家 Jupenlijia, Yantai, Shandong	37°31.978′N, 121°12.106′E	幼虫 Larval	桃 Peach	2011.08
YXS	22	山东烟台西三里店 Xisanlidian, Yantai, Shandong	37°18.319′N, 120°48.673′E	成虫 Adult	苹果 Apple	2011.08
YFS	20	山东烟台福山 Fushan, Yantai, Shandong	37°31.978′N, 121°12.106′E	成虫 Adult	梨 Pear	2011.08
XQX	22	陕西咸阳乾县 Qianxian, Xianyang, Shaanxi	34°51.704′N, 108°49.542′E	成虫 Adult	苹果 Apple	2013.08
WCC	22	陕西渭南澄城 Chengcheng, Weinan, Shaanxi	35°21.661′N 109°52.492′E	成虫 Adult	苹果 Apple	2013.08
YMZ	20	陕西榆林米脂 Mizhi, Yulin, Shaanxi	36°50.433′N 110°15.070′E	成虫 Adult	苹果 Apple	2013.08

1.3 引物合成

根据已有报道，选取 10 对已经应用到其他国家梨小食心虫种群遗传学研究的微卫星引物（Torriani *et al.*, 2010）以及 1 对苹果蠹蛾的微卫星引物（Zhou *et al.*, 2005），参照 Schuelke（2000）的方法，利用 3 条引物 PCR 扩增各微卫星等位基因，第 1 条引物为在 5′端加上 M13 正向引物的上游引物，第 2 条为不经过任何修饰的下游引物，第 3 条为 5′端经过羧基荧光酶（FAM）修饰的 M13 序列。所有引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.4 PCR 扩增及基因型检测

本研究使用的伯乐 C1000 PCR 仪购自美国伯乐（Bio-Rad）生命医学产品（上海）有限公司，PCR 相关试剂均购自生工生物工程（上海）股份有限公司。PCR 反应体系的总体积为 25 μL，其中包括 12.5 μL Taq MasterMix，上游引物（10 μmol/L）0.5 μL，下游引物（10 μmol/L）及 M13 引物（10 μmol/L）各 2.0 μL，模板 DNA 2.0 μL，H_2O 6.0 μL。PCR 扩增反应由两步 PCR 构成。反应条件如下：95℃预变性 10 min；95℃变性 30 s，各引物特异退火温度（表 2）45 s，72℃延伸 45 s，共 30 个循环；然后 95℃变性 30 s，53℃（M13 序列特异退火温度）退火 45 s，72℃延伸 45 s，共 8 个循环；最后 72℃补偿延伸 10 min。将 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增情况后，将目标产物送生工生物工程（上海）股份有限公司进行微卫星分型。

表 2 用于梨小食心虫样本分析的 11 个微卫星位点的特性

Table 2 Characterization of 11 microsatellite loci for the analysis of *Grapholita molesta* samples

位点 Loci	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5′-3′) Primer sequences	重复结构 Repeat motif	退火温度(℃) Annealing temperature
Gm01	HM177459	F：TGCGGTAGGCTCTCAGTTATC R：ATGCTACATACGCCCAAACC	(AC)14	56
Gm02	HM177460	F：CTCAGACCTGAGGGAACGAC R：CAACACACAGTAAGTTGAGTTTTGTC	(GA)22	56
Gm03	HM177461	F：TCCTCAGCAGTGAAGTACCG R：TTGAGTTCGGGAATTGAACC	(AG)20(CA)2(GA)11	56
Gm04	HM177462	F：GGATGACTAAGTAAGCGGATTTC R：CTTTTGGTAAGGCACCCATC	(TC)10(CC)(TC)3(TG)12	56
Gm05	HM177463	F：CAAGCAGTAATCGCAAACATC R：TGAGGACCAAGATGGTAGACAC	(CA)7..(CA)14..(AC)11	56
Gm06	HM177464	F：CCTATGTCACCAGCCTGAGC R：TGTAATACCAGTATCCAATAGTACGAC	(GT)4(ATGA)(TA)3 (TG)2(AGTTA)(GT)12	56
Gm07	HM177465	F：GCAGGAAGCGATACTGCAAC R：GAAGCATCGAACCTTGTCG	(TGTA)6	50
Gm08	HM177466	F：CCTACCCCTCTGGGAAACAG R：CTGGGCATCCTTCCGTTAG	(GTAT)6	56
Gm09	HM177467	F：CCACCGCTTCTTGTGGATAC R：CCGTGGCTGAGGAAGTAAAG	(TG)4(AT)(GT)14	56
Gm10	HM177468	F：GTAGCGTTGACAGGCGTTG R：TGCGTTTACTTAGAGTATCTGTGC	(CA)17	50
Cyd15	AY688628	F：AACCCTTATAGGATCACTTTG R：TGTCGAAGCTTAGAAGATTG	(GTCC)2(GTCR)5	54

1.5 数据分析

利用 GenALEx 6.501 (Peakall and Smouse, 2012)软件计算各位点及各种群的平均等位基因数(mean number of alleles, N_A)、私有等位基因数量(private number of alleles, P_A)、平均观察杂合度(observed heterozygosity, H_o)、平均期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)及近交系数(inbreeding coefficient, *Fis*)，并对各位点在不同种群上的基因型连锁不平衡(genotypic linkage disequilibrium)进行了分析；利用 ADZE 1.0(Szpiech *et al.*, 2008)软件计算各种群的等位基因丰富度(allelic richness, *R*)。利用 PIC-Calc 0.6(Shao *et al.*, 2013)软件计算各位点的多态信息含量(polymorphism information content, *PIC*)；利用 Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004)软件对各位点的无效等位基因频率(null allele frequency, N_a)进行分析；利用 Genepop 4.0.1 (Rousset, 2008)软件对各位点的哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)进行检验。

2 结果与分析

2.1 梨小食心虫中微卫星位点的扩增效果及稳定性分析

所选的 11 个微卫星位点在所有样本中的 PCR 扩增结果显示，位点 Gm02，Gm06，Gm07，Gm08，Gm09 和 Gm10 等 6 个位点在各种群中均能稳定扩增，扩增稳定性达 94% ~100%，尽管有些位点在少数个体中无法扩增，但不影响总体数据分析；位点 Gm01，Gm03，Gm04 和 Cyd15 在各种群中均无法扩增；位点 Gm05 扩增成功率比较低(22%)(表 3)。

表 3 11 个微卫星位点在梨小食心虫样本中的扩增稳定性分析

Table 3 The amplification stability of 11 microsatellite loci in *Grapholita molesta* samples

位点 Loci	成功扩增的个体数 Number of amplified individuals	扩增成功率(%) Amplification rate	扩增稳定性 Amplification stability
Gm01	0	0	无法扩增 Unamplified
Gm02	253	98	稳定 Stable
Gm03	0	0	无法扩增 Unamplified
Gm04	0	0	无法扩增 Unamplified
Gm05	56	22	不稳定 Unstable
Gm06	249	97	稳定 Stable
Gm07	241	94	稳定 Stable
Gm08	257	100	稳定 Stable
Gm09	257	100	稳定 Stable
Gm10	254	99	稳定 Stable
Cyd15	0	0	无法扩增 Unamplified

2.2　梨小食心虫中稳定扩增位点的无效等位基因

利用 Micro-Checker 分析了稳定扩增位点的无效等位基因频率情况(表 4)，各位点的无效等位基因频率范围在 0.020 ~ 0.257 之间，其中位点 Gm06 的无效等位基因频率最高，位点 Gm10 的无效等位基因频率次之(0.201)，位点 Gm07 的无效等位基因频率最低。

2.3　梨小食心虫中稳定扩增位点的遗传多态性分析

为了更好地评价各位点是否适合我国梨小食心虫的种群遗传学相关研究，将扩增稳定的 6 个微卫星位点进行了遗传多态性分析。结果显示，各位点的平均等位基因数(N_A)范围为 3.083 ~ 12.500，平均为 8.6388，其中位点 Gm09 平均等位基因数最高，位点 Gm07 最低；各位点杂合子数(*Homs*)范围为 24 ~ 161 个，纯合子数(*Hets*)为 96 ~ 217 个；各位点平均观察杂合度(H_o)范围为 0.103 ~ 0.655，平均期望杂合度(H_e)范围为 0.124 ~ 0.846；各位点多态信息含量(*PIC*)范围为 0.123 ~ 0.935；位点 Gm07 的观察杂合度和多态信息含量均很低，分别为 0.103 和 0.124，其在所有种群中只有 24 个杂合子，杂合子明显不足。因此，该位点属于低度多态性位点，不适合用于种群遗传学研究，而 Gm02，Gm06，Gm08，Gm09 和 Gm10 5 个位点具有较高的遗传多态性，可以用于梨小食心虫的种群遗传学研究之中。

表 4　在不同地区梨小食心虫样本中稳定扩增的 6 个微卫星位点的遗传多态性

Table 4　Genetic polymorphism of the six stably amplified microsatellite loci in *Grapholita molesta* samples from different regions

位点 Loci	平均等位基因数 Mean number of alleles N_A	纯合子数 Number of homozygote *Homs*	杂合子数 Number of heterozygote *Hets*	平均观察杂合度 Mean observed heterozygosity *Ho*	平均期望杂合度 Mean expected heterozygosity *He*	多态信息含量 Polymorphism information content *PIC*	无效等位基因频率 Null allelic frequency N_a
Gm02	7.417	129	124	0.486	0.642	0.800	0.182
Gm06	9.500	158	91	0.366	0.734	0.827	0.257
Gm07	3.083	217	24	0.103	0.124	0.123	0.020
Gm08	8.833	96	161	0.655	0.747	0.847	0.109
Gm09	12.500	103	154	0.600	0.846	0.935	0.173
Gm10	10.500	127	127	0.514	0.758	0.886	0.201

2.4　梨小食心虫中稳定扩增位点的基因连锁情况分析

基于 Fisher 方法检测了筛选出的 5 个多态性较好的微卫星位点的基因型连锁情况，结果表明，各位点不存在显著的连锁情况，均独立遗传(表 5)。为进一步验证各位点的连锁情况，利用 Arlequin 中的基因型连锁不平衡检测程序对所有位点进行随机比较，结果表明，在所有 120 对微卫星位点中，39 对微卫星位点显示出基因连锁，尽管连锁不平衡位点分布广泛，但均未表现出某一位点全部连锁。

2.5　梨小食心虫各种群在稳定扩增位点上的哈迪-温伯格平衡检验

利用 Genepop 软件中的马尔科夫链法，并通过显著水平检验 5 个多态性较好的稳定扩增位点是否符合哈迪-温伯格平衡。结果显示，5 个微卫星位点在 12 个梨小食心虫种群中哈迪温伯格平衡检验结果表明部分种群均存在不同程度的偏离哈迪-温伯格平衡；进一步对各种群的杂合子进行正合检验，发现所有表现偏离哈温平衡的种群均表现出杂合子不足现象(表 6)。

表 5　梨小食心虫所有种群 5 个微卫星的成对位点间遗传连锁分析

Table 5　Analysis of disequilibrium of pairwise loci across all populations of *Grapholita molesta*

成对位点 Pairwise loci	卡方值 Chi-square value	自由度 *df*	*P* 值 *P*-value
Gm02 & Gm06	23.808	24	0.473
Gm02 & Gm08	10.212	24	0.994
Gm06 & Gm08	22.034	24	0.577
Gm02 & Gm09	19.778	22	0.597
Gm06 & Gm09	26.027	22	0.251
Gm08 & Gm09	22.556	22	0.427
Gm02 & Gm10	8.478	24	0.999
Gm06 & Gm10	11.928	24	0.981
Gm08 & Gm10	21.075	24	0.634
Gm09 & Gm10	12.518	22	0.946

2.6　基于微卫星位点标记的不同地理种群遗传多态性分析

利用 Genepop 软件对所有样品微卫星数据进行遗传多样性统计。结果显示，12 个梨小食心虫地理种群的平均等位基因数量范围在 7.4 ~ 15.8 之间；私

有等位基因数范围为 0.6 ~ 4.2；等位基因丰富度在 1.660 ~ 1.871 之间；观察杂合度范围为 0.414 ~ 0.616；期望杂合度范围为 0.640 ~ 0.848，由此可见，山东和陕西梨小食心虫种群均具有丰富的遗传多样性(表 7)。

表 6 梨小食心虫各种群在 5 个位点上的哈迪-温伯格平衡 *P* 值

Table 6 Hardy-Weinberg equilibrium *P* value in each population of *Grapholita molesta* at the five microsatellite loci

位点 Loci	地理种群 Geographic populations											
	TNM	TSZ	TXJ	WHS	WPY	WTY	YJP	YXS	YFS	XQX	WCC	YMZ
Gm02	0.000 **	0.000 **	0.388	0.644	0.154	0.047 *	0.020 *	0.000 **	0.000 **	0.257	0.339	0.024 *
Gm06	0.000 **	0.000 **	0.000 **	0.052	0.002 **	0.001 **	0.000 **	0.000 **	0.000 **	0.000 **	0.000 **	0.000 **
Gm08	0.833	0.001 **	0.352	0.197	0.497	0.000 **	0.232	0.010 *	0.126	0.660	0.022 *	0.039 *
Gm09	0.001 **	0.000 **	0.027 *	0.003 **	0.000 **	0.810	0.303	0.000 **	0.000 **	0.004 **	0.071	0.000 **
Gm10	0.001 **	0.000 **	0.027 *	0.003 **	0.000 **	0.810	0.303	0.000 **	0.000 **	0.004 **	0.071	0.000 **

* 显著偏离哈迪-温伯格平衡 Significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium; ** 极显著偏离哈迪-温伯格平衡 Highly significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium.

表 7 基于 5 个微卫星位点标记的不同地理种群遗传多样性统计

Table 7 Population statistics for *Grapholita molesta* populations from different regions based on data of five microsatellite loci

种群 Population	样本数 Number *N*	平均等位基因数 Mean number of alleles N_A	私有等位基因数 Private number of alleles P_A	等位基因丰富度 Allelic richness *R*	观察杂合度 Observed heterozygosity *Ho*	期望杂合度 Expected heterozygosity *He*	近交系数 Inbreeding coefficient *Fis*
TNM	22	10.6	1.2	1.800	0.609	0.807	0.251
TSZ	22	12.6	4.0	1.800	0.494	0.834	0.414
TXJ	22	8.6	0.8	1.816	0.555	0.701	0.203
WHS	22	8.2	0.8	1.855	0.518	0.693	0.237
WPY	22	9.0	1.2	1.718	0.486	0.722	0.314
WTY	22	11.4	1.2	1.710	0.564	0.810	0.300
YJP	19	8.0	1.2	1.743	0.508	0.640	0.170
YXS	22	15.8	4.2	1.829	0.496	0.848	0.415
YFS	20	9.8	2.4	1.660	0.540	0.771	0.297
XQX	22	7.4	0.6	1.871	0.616	0.702	0.147
WCC	22	7.6	1.0	1.790	0.491	0.682	0.305
YMZ	20	8.0	1.0	1.709	0.414	0.734	0.432

3 讨论

微卫星标记是种群遗传学研究中应用最广泛的分子标记之一(Bancroft *et al.*, 1995; Darvill *et al.*, 2006)，但其开发费用较高，而且开发新的微卫星需要较长时间，从已经报道的同种或者近缘物种的微卫星中筛选适合的微卫星位点，是目前常用的方法。微卫星位点的侧翼区虽然在种内具有高度的保守性，但在不同种群，特别是不同地理种群间也可能发生突变，从而造成微卫星位点扩增失败(Paetkau and Strobeck, 1995)。Meglecz 等(2004)研究发现，鳞翅目昆虫的微卫星侧翼区较其他昆虫如半翅目昆虫的变异性更大。Ravel 等(2002)利用 16 个微卫星位点研究非洲西部埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 种群遗传分化发现，已报道的位点 19，GA 和 C 等 3 个微卫星位点可以在所有埃及伊蚊样本中成功扩增，而位点 54 和 LF 表现出现明显的扩增不稳定性和较低的遗传多态性。门秋雷等(2012)利用欧洲苹果蠹蛾种群筛选的微卫星位点研究中国苹果蠹蛾样本时，发现部分位点存在扩增不稳定性。由于微卫星 DNA 侧翼区的保守性直接影响着位点的扩增稳定性(Moore *et al.*, 1991; Primmer *et al.*, 1996)，因此必须运用较多的样本，对已经报道的微卫星位点进行筛选，以确定筛选的位点是否适合用于特定的生物样本，本研究分析了已经报道的 11 对微卫星引物在我国采集的 257 头梨小食心虫样本中的扩增稳定性和位点多态性情况，结果表明，其中的 5 个位点(Gm02，Gm06，Gm08，Gm09 和 Gm10)扩增效果较好并且多态性丰富。本研究

中发现，采自我国的梨小食心虫样本中的微卫星等位基因片段大小和欧洲种群中报道的片段大小具有一定的差异，Gm02，Gm06 和 Gm08 在意大利北部梨小食心虫样本中的片段长度在 100 bp 左右（Torriani *et al*., 2010），而本研究中这 3 个位点的等位基因有 200 bp 左右的较大片段，这可能是梨小食心虫不同地理种群之间的差异或者随机取样的差异造成。

无效等位基因的存在影响着微卫星标记的应用（文亚峰等，2013）。本研究中 5 个扩增稳定且多态性较好的位点在各种群中的无效等位基因频率范围为 0.109 ~ 0.257，这与已报道的该虫的无效等位基因频率结果相似（Torriani *et al*., 2010；Kirk *et al*., 2013）。大量的研究表明，一定程度的微卫星无效等位基因频率在鳞翅目害虫中广泛存在，但并不影响这些微卫星位点在相关研究中的应用（Sarhan，2006；Chen and Dorn，2010；Torriani *et al*., 2010；Kirk *et al*., 2013）。

连锁不平衡是指群体内不同位点等位基因间的非随机性组合的关系。分析连锁不平衡的原因可能包括交配体系、自然选择、遗传搭车、突变和重组、随机遗传漂变以及基因流等。本研究的所有 120 对微卫星位点中，39 对微卫星位点显示出基因连锁。虽然连锁不平衡位点分布广泛，但不存在某一位点全部连锁的情况，表明筛选出的各位点在我国梨小食心虫基因组中分布均匀，世代传递过程中相对独立，这一结果与 Torriani 等（2010）对梨小食心虫欧洲种群的微卫星位点连锁不平衡分析结果相似。

哈迪-温伯格平衡是指在一个随机交配的大群体中，在没有选择、突变、迁移等因素的作用下，基因频率和基因型频率在世代间保持恒定。本研究中各位点在部分种群表现出偏离哈迪-温伯格平衡，这可能是种群杂合子不足造成。已有的研究发现，梨小食心虫和苹果蠹蛾这类飞行能力较弱的昆虫，其种群内较高的自交率及种群有限的基因交流会导致种群偏离哈迪温伯格平衡（Chen and Dorn，2010；Kirk *et al*., 2013）。

等位基因的数量和期望杂合度是用于分析群体内遗传变异程度和微卫星位点遗传多态性的重要指标，等位基因数容易受到样本量的影响（Maudet *et al*., 2002），样本大小与观测到每个位点的等位基因数、平均等位基因数及基因丰富度指数均成显著正相关（闫路娜和张德兴，2004）。本研究结果显示，梨小食心虫 Gm02，Gm06，Gm08，Gm09 和 Gm10 5 个位点具有较高的等位基因数量和平均期望杂合度，因此，这 5 个微卫星位点可以进一步应用于梨小食心虫的种群遗传学研究中。

参考文献（References）

An JD, Huang JX, Dong J, Zhou BF. 2011. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Bombus pyrosoma* (Hymenoptera, Apidae), a bumblebee species endemic to China. *Acta Entomologica Sinica*, 54(12): 1423 - 1432. [安建东，黄家兴，董捷，周冰峰，2011. 火红熊蜂微卫星标记的筛选及种特异性分析. 昆虫学报，54(12)：1423 - 1432]

Bancroft DR, Pemberton JM, King P, 1995. Extensive protein and microsatellite variability in an isolated, cyclic ungulate population. *Heredity*, 74(3): 326 - 336.

Chen M, Dorn S, 2010. Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 100(1): 75 - 85.

Chen MX, Luo YQ, Zhao CJ, Tao WQ, Ma WE, Wang H, Yu JX, 2009. Research advance on *Grapholitha molests* Busck. *Northern Horticulture*, (8): 144 - 147. [陈梅香，骆有庆，赵春江，陶万强，马万娥，王合，禹菊香，2009. 梨小食心虫研究进展. 北方园艺，(8)：144 - 147]

Darvill B, Ellis J, Lye GC, Goulson D, 2006. Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology*, 15(3): 601 - 611.

Fenton B, Margaritopoulos JT, Malloch GL, Foster SP, 2010. Micro-evolutionary change in relation to insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Ecological Entomology*, 35: 131 - 146.

Franck P, Timm A, 2010. Population genetic structure of *Cydia pomonella*: a review and case study comparing spatiotemporal variation. *Journal of Applied Entomology*, 134(3): 191 - 200.

Gong P, Yang XW, Tan SJ, Chen XF, 2001. Molecular genetics markers and their application in entomology. *Entomological Knowledge*, 38(2): 86 - 91. [龚鹏，杨效文，谭声江，陈晓峰，2001. 分子遗传标记技术及其在昆虫科学中的应用. 昆虫知识，38(2)：86 - 91]

He C, 2008. Studies on Sex Pheromone Mass Trapping, Mating Disruption and Biorational Control of *Grapholita molesta*. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [何超，2008. 梨小食心虫性诱干扰及无害化防治技术研究. 陕西杨凌：西北农林科技大学硕士学位论文]

Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH, Yoo N, 2008. Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Human Pathology*, 39(7): 1059 - 1063.

Kirk H, Dorn S, Mazzi D, 2013. Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. *Evolutionary Applications*, 6(5): 842 - 856.

Maudet C, Bassano B, Breitenmoser-Wiirsten C, Gauthier D, Obexer-

Ruff, Luikart G, 2002. Microsatellite DNA and application in Alpine ibex [*Capra ibex* (ibex)]. *Molecular Ecology*, 11(3): 421-436.

Meglecz E, Petenian F, Danchin E, D'Acier AC, Rasplus JY, Faure E, 2004. High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology* , 13 (6): 1693-1700.

Men QL, Chen MH, Zhang YL, Feng JN, 2012. Amplifying stability and genetic diversity of microsatellite loci in codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) populations in China. *Acta Phytophylcaica Sinica*, 39(4): 341-346. [门秋雷, 陈茂华, 张雅林, 冯纪年, 2012. 中国疫区内苹果蠹蛾微卫星位点的扩增稳定性及遗传多样性. 植物保护学报, 39(4): 341-346]

Mikac KM, 2010. Genetic structure and dispersal patterns of the invasive psocid *Liposcelis decolor* (Pearman) in Australian grain storage systems. *Bulletin of Entomological Research*, 100: 521-527.

Moore S, Sargeant L, King T, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJS, 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10(3): 654-660.

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P, 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 535-538.

Paetkau D, Strobeck C, 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bear. *Molecular Ecology*, 4 (4): 519-520.

Peakall R, Smouse PE, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.

Primmer CR, Moller AP, Ellegren H, 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5(3): 365-378.

Ravel S, Hervé JP, Diarrassouba S, 2002. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Côte d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouaké. *Acta Tropica*, 82(1): 39-49

Roderick GK, 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41(1): 325-352.

Rothschild GHL, Vickers RA, 1991. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth. In: van der Geest LPS, Evenhuids HH eds. World Crop Pests. Vol. 5. Tortricid Pests their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier, Amsterdam. 389-412.

Rousset F, 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1): 103-106.

Sarhan A, 2006. Isolation and characterization of five microsatellite loci in the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 163-164

Schuelke M, 2000. An economic method for the fluorescent laelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 15: 233-234.

Shao K, Xiong M, Xu N, Zhu B, Shi F, 2013. Characterization of microsatellite loci in *Sinilabeo rendahli* and cross-amplification in four other Chinese cyprinid species. *Conservation Genetic Resources*, 5(1): 9-13.

Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA, 2008. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, 24(21): 2498-2504.

Timm AE, Geertsema H, Warnich L, 2008. Population genetic structure of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in South Africa. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(1): 197-203.

Torriani MVG, Mazzi D, Hein S, Dorn S, 2010. Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. *Molecular Ecology*, 19(13): 2651-2660.

Wang YM, Shen ZR, Gao LW, 2007. Microsatellite markers and their application in aphid population biology. *Acta Entomologica Sinica*, 50 (6): 621-627. [王永模, 沈佐锐, 高灵旺, 2007. 微卫星标记及其在蚜虫种群生物学研究中的应用. 昆虫学报, 50(6): 621-627]

Wang YM, Zhao KJ, Xu J, 1999. Chinese Deciduous Fruit Pests. Knowledge Press, Beijing. [王源岷, 赵魁杰, 徐筠, 1999. 中国落叶果树害虫. 北京: 知识出版社]

Weber JL, May PE, 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44(3): 388-396.

Wen YF, Han WJ, Xie WD, Xu GB, 2013. Null alleles in microsatellite markers. *Biodiversity Science*, 21(1): 117-126. [文亚峰, 韩文军, 谢伟东, 徐刚标, 2013. 微卫星标记中的无效等位基因. 生物多样性, 21(1): 117-126]

Yan LN, Zhang DX, 2004. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers. *Acta Zoologica Sinica*, 50(2): 279-290. [闫路娜, 张德兴, 2004. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响. 动物学报, 50(2): 279-290]

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1): 1-16.

Zhang DX, 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(10): 507-509.

Zhang L, 2007. Research process and application of microsatellite DNA markers. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35 (4): 972-975. [张玲, 2007. 微卫星 DNA 标记研究进展及应用. 安徽农业科学, 35 (4): 972-975]

Zhou Y, Gu H, Dorn S, 2005. Isolation of microsatellite loci in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Molecular Ecology Notes*, 5(2): 226-227.

(责任编辑: 赵利辉)